



四川大學

华西第二医院 | 华西妇产儿童医院

West China Second University Hospital, West China Women's and Children's Hospital

儿童下呼吸道感染细菌培养

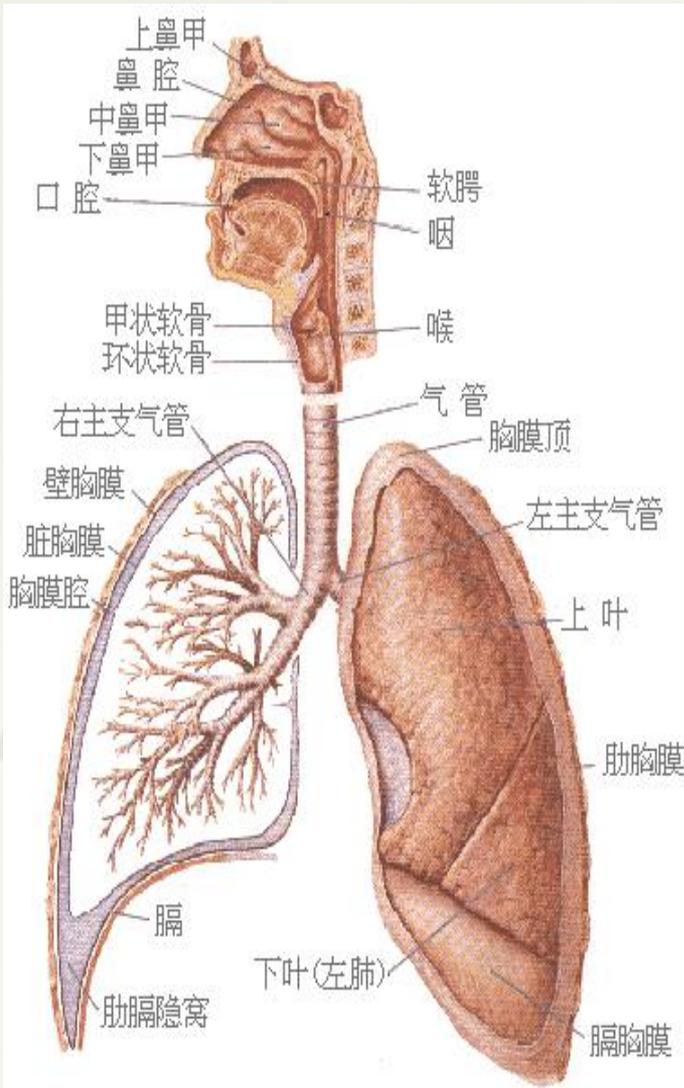
四川大学华西第二医院临床检验科

周伟

提纲

- 背景介绍
- 如何采集一个合格的痰标本
- 实验室标本的处理（涂片很重要）
- 下呼吸道重要病原菌特点（有哪些、会识别）
- 结果报告及解释
- 质量控制

呼吸道正常菌群



解剖部位

口咽部

正常菌群

β -溶血链球菌 (A群除外)、非溶血链球菌、草绿色链球菌、奈瑟菌属、嗜血杆菌属、棒状杆菌属 (除白喉棒状杆菌)、微球菌、葡萄球菌、少量酵母样菌和肠杆菌科细菌、厌氧菌 (包括类杆菌、梭杆菌属、韦荣球菌属、消化链球菌)

前鼻

凝固酶阴性葡萄球菌、极少量金黄色葡萄球菌、类白喉

喉或喉以下

通常为无菌

人体基础条件的变化会改变定值菌的种类和数量

上呼吸道感染主要类型及主要病原菌

- 大部份为病毒感染
- 细菌性咽炎常由化脓性链球菌引起。严重的会厌炎和喉气管炎可能由type B型流感嗜血杆菌引起
- 急性鼻窦炎的常见细菌为肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、卡他莫拉菌，其次为金黄色葡萄球菌、化脓链球菌、G-杆菌和厌氧菌等
- 慢性鼻窦炎通常为需氧菌和厌氧菌混合感染

下呼吸道感染主要类型及主要病原菌

表 A.1 下呼吸道感染的主要类型及主要病原体

类型/免疫状态	最常见病原菌	少见病原菌
社区获得性(典型)肺炎 ^a	肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、肺炎克雷伯菌	金黄色葡萄球菌、卡他莫拉菌、脑膜炎奈瑟菌
社区获得性非典型肺炎 ^b	肺炎支原体、呼吸道病毒、流感病毒、肺炎衣原体、军团菌属	沙眼衣原体、结核分枝杆菌、真菌等
吸入性肺炎	厌氧菌、金黄色葡萄球菌、需氧革兰阴性杆菌	
医院获得性肺炎	革兰阴性杆菌(肠杆菌属/克雷伯菌属/不动杆菌属/假单胞菌属)、金黄色葡萄球菌、厌氧菌、社区获得性肺炎的典型菌	军团菌,肺炎链球菌
血液播散性肺炎	金黄色葡萄球菌、链球菌	需氧革兰阴性杆菌
免疫抑制宿主条件致病菌感染性肺炎	社区获得性肺炎典型菌、奴卡菌属、念珠菌属、条件致病真菌、曲霉菌	
环境暴露 ^c 引起的肺炎	结核分枝杆菌、军团菌属、双相真菌、曲霉属、肺炎支原体、肺炎衣原体	鼻疽假单胞菌、假鼻疽假单胞菌、鼠疫耶尔森菌、贝纳柯克斯体、图拉热弗朗西斯菌
急性气管炎	病毒,百日咳博德特菌,肺炎支原体和肺炎衣原体	

- 下呼吸道感染病原菌多样，选择合适的标本尤为重要，因为标本很容易受到口咽部菌群的污染，导致检测结果与临床不符，误导临床诊断与治疗。
- 痰培养仅用于下呼吸道感染，主要是肺部感染的诊断。但它不是诊断肺部感染的最佳标本。
- 痰涂片可以提高下呼吸道病原菌学诊断的特异性和敏感性。涂片革兰染色可评估痰标本质量；发现培养不能生长的细菌。

病例

✓ **患儿女**，3月1天，因“反复咳嗽、发热20+天，院外治疗8天期间合并I型呼吸衰竭”收入PICU。

✓ **查体**：T38°C，P145次/分，R55次/分，BP92/56mmHg，SPO₂ 95%（鼻导吸氧下）。急性重病容，神志清楚，余无异常。

✓ **实验室及其他检验结果：**

院外WBC $31.19 \times 10^9/L$ ，N 51.7%，HGB 117g/L，PLT $452 \times 10^9/L$ ，CRP 71.86mg/L。

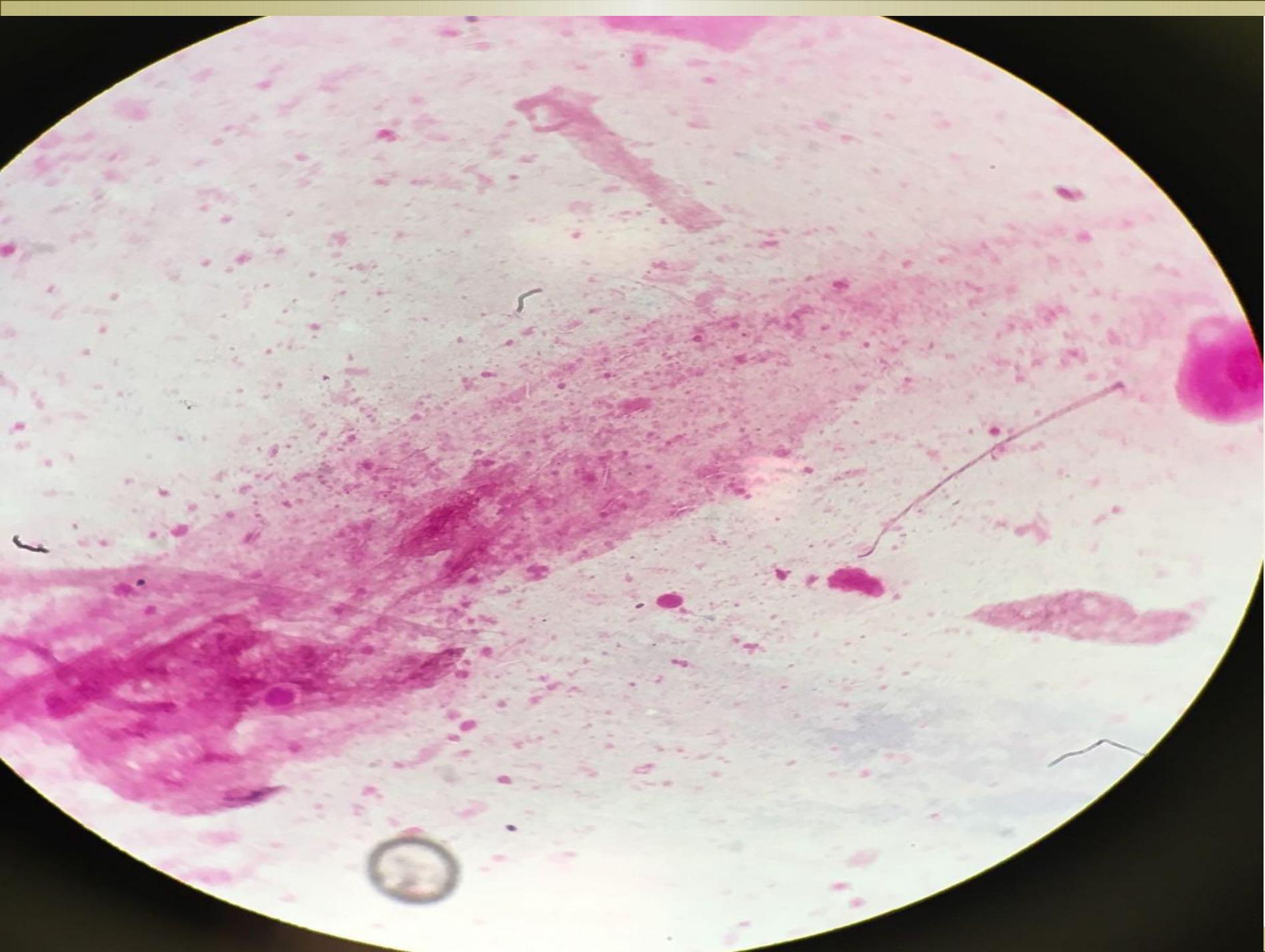
血培养：表皮葡萄球菌（万古霉素敏感）

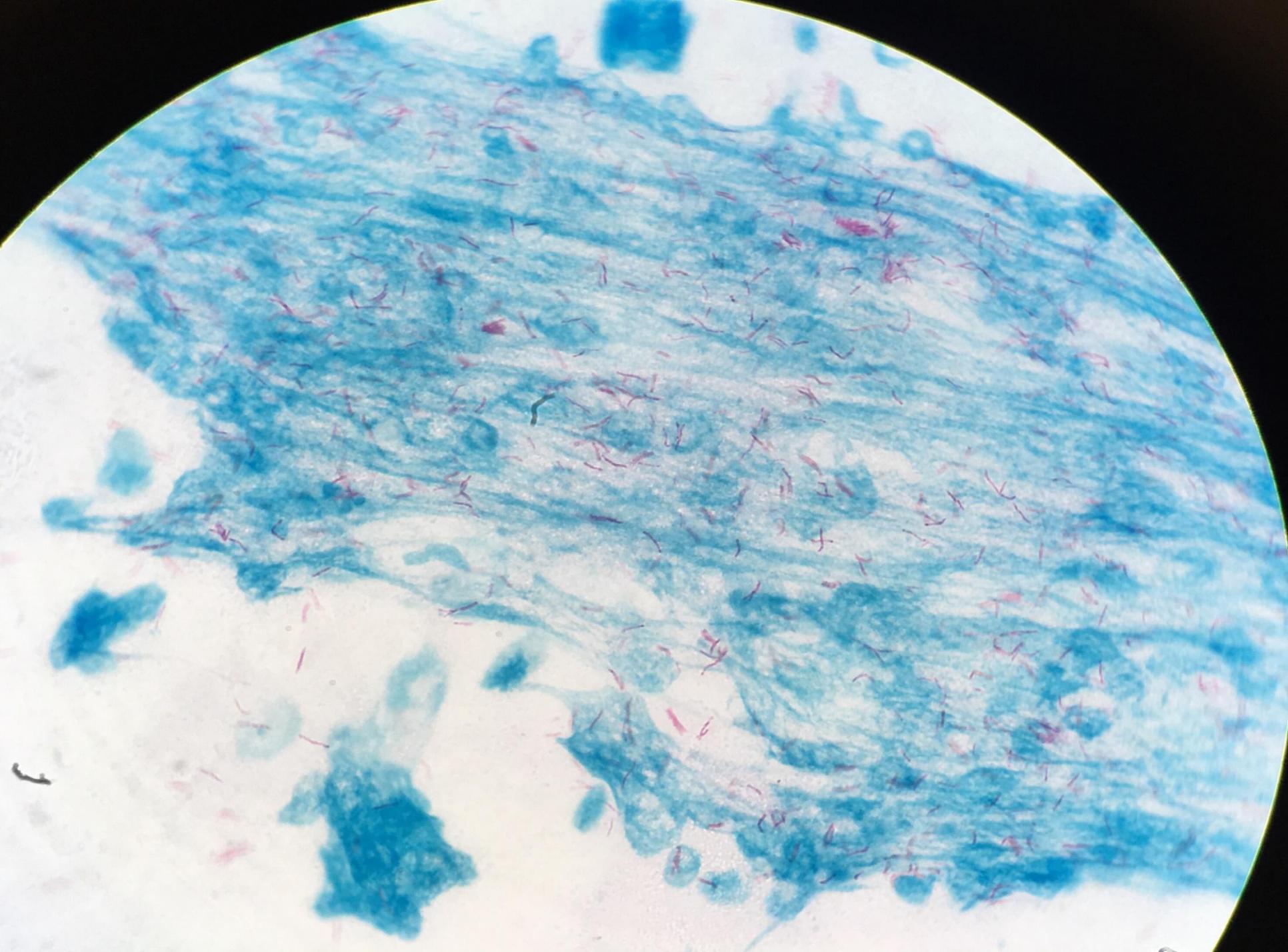
痰培养：肺炎克雷伯菌、大肠埃希菌；

胸部CT提示：双肺纹理模糊，左下肺叶后基底段可见条片影，右肺上叶后段及右肺下叶肺实质表现，炎性病变可能，其它待排。

✓ **入院诊断**：1、重症肺炎，2、脓毒症血流感染（表皮葡萄球菌）

✓ **抗生素治疗**：万古+美平





- ✓ 入院后辅助检查：
- ✓ 血培养：阴性；MP快速培养、PCR阴性；衣原体核酸、呼吸道病毒七联检、真菌G试验阴性。
- ✓ 痰查抗酸杆菌阳性（4+）。
- ✓ 结核感染T细胞：阳性。
- ✓ 结核培养：阳性

- ✓ 吡嗪酰胺+盐酸乙胺丁醇+ 异烟肼+利福平 → 停用利福平+异烟肼+丙嗪酰胺以及美平和万古霉素，加阿米卡星+左氧氟沙星抗结核及保肝治疗

- ✓ 患儿母亲1+年前在当地传染病院诊断为肺结核，强化治疗2月后复诊，医生嘱继续巩固治疗，患儿母亲因发现自己怀孕故自行中断治疗

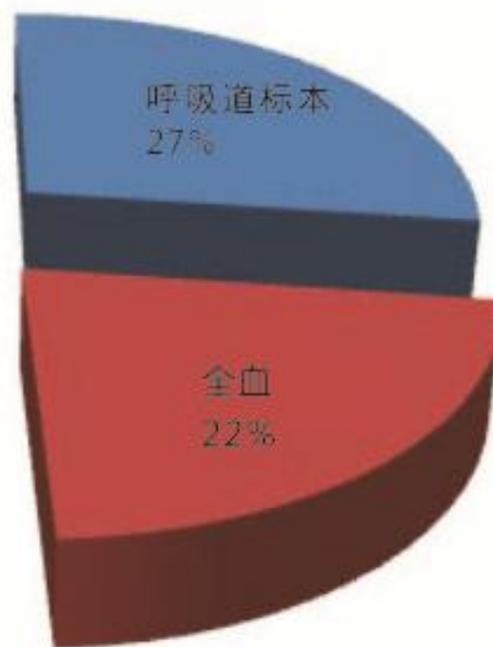
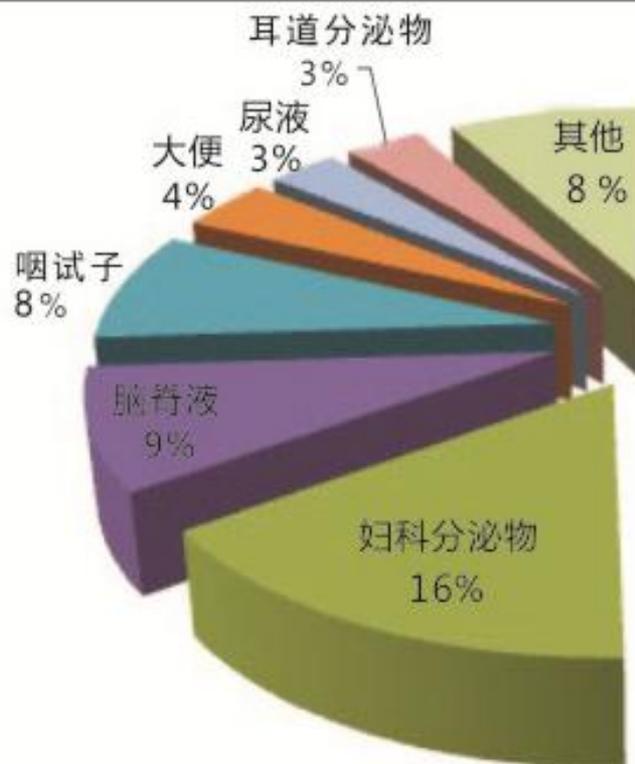
痰标本是目前国内实验室最主要的标本

序号	标本来源	标本数	(%)
1	痰	8750	62.1
2	血	1268	9.0
3	分泌物	933	6.6
4	脓	864	6.1
5	咽喉	407	2.9
6	拭子	368	2.6
7	粪便	335	2.4
8	尿	326	2.3
9	体液	103	0.7
10	腹水	98	0.7

我省的情况

全院标本送检情况及病原菌分布

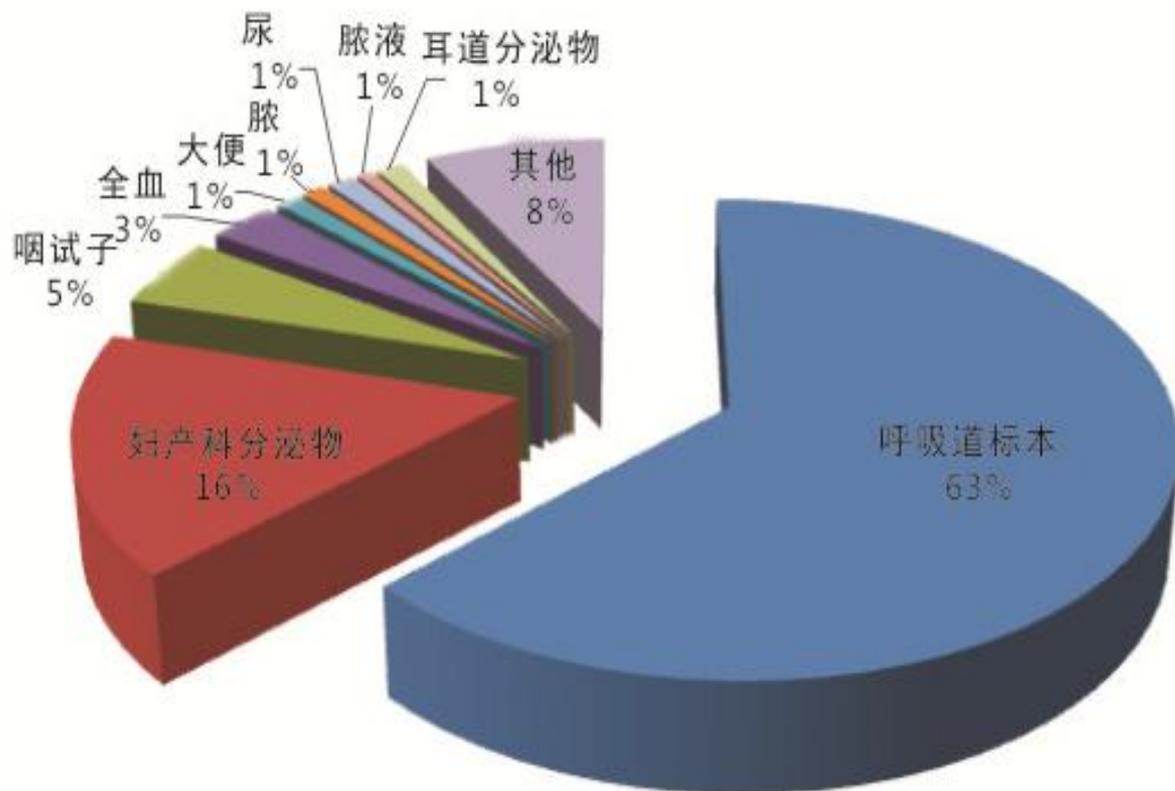
全院47557份培养标本送检构成比



我院的情况

全院标本送检情况及病原菌分布

全院6073株病原菌的标本来源分布

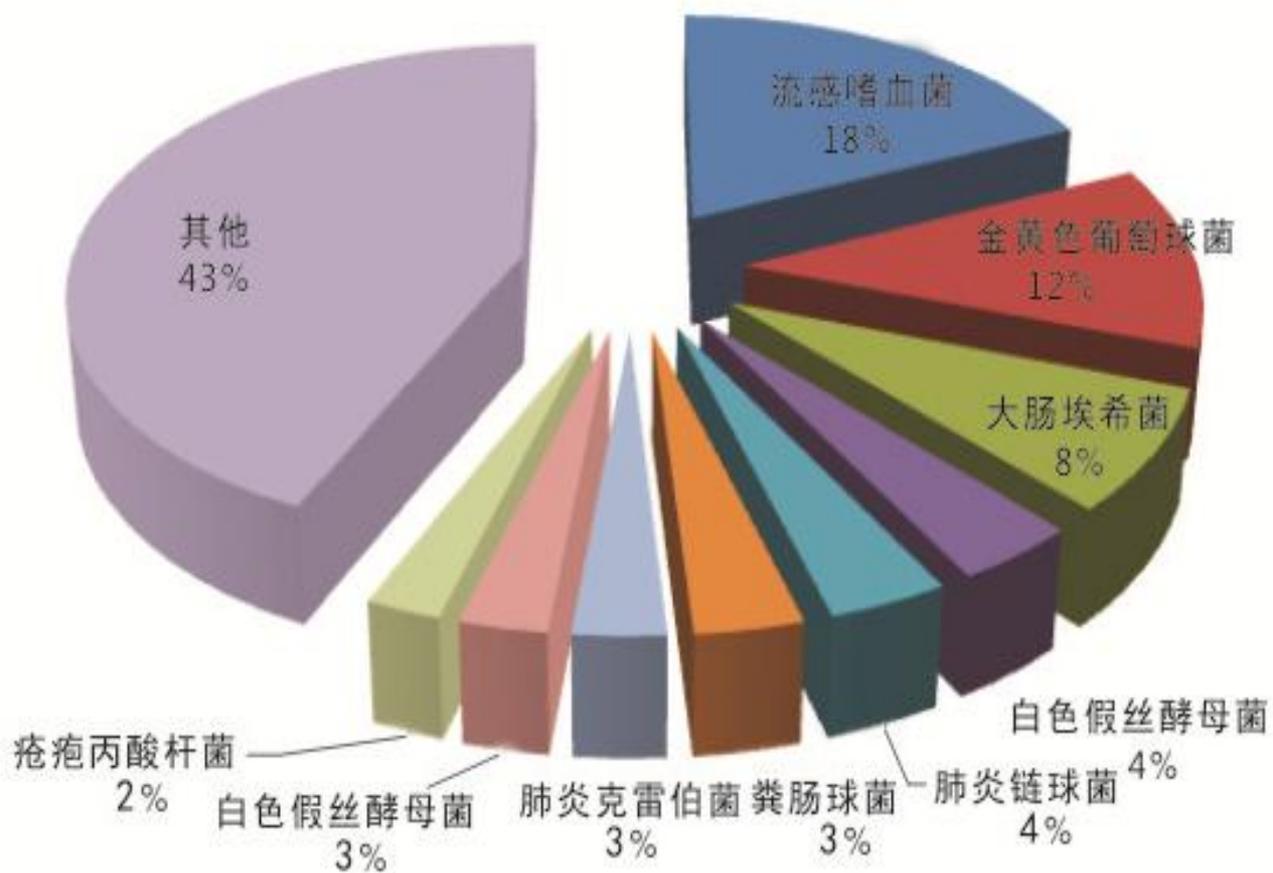


我院的情况

序号	细菌	株	百分率
1	大肠埃希菌	2948	17.8%
2	金黄色葡萄球菌	2321	14.0%
3	肺炎链球菌	2031	12.2%
4	肺炎克雷伯菌	1885	11.4%
5	凝固酶阴性葡萄球菌	1481	8.9%
6	流感嗜血杆菌	1382	8.3%
7	卡它莫拉菌	581	3.5%
8	阴沟肠杆菌	557	3.4%
9	铜绿假单胞菌	446	2.7%
10	鲍曼不动杆菌	383	2.3%

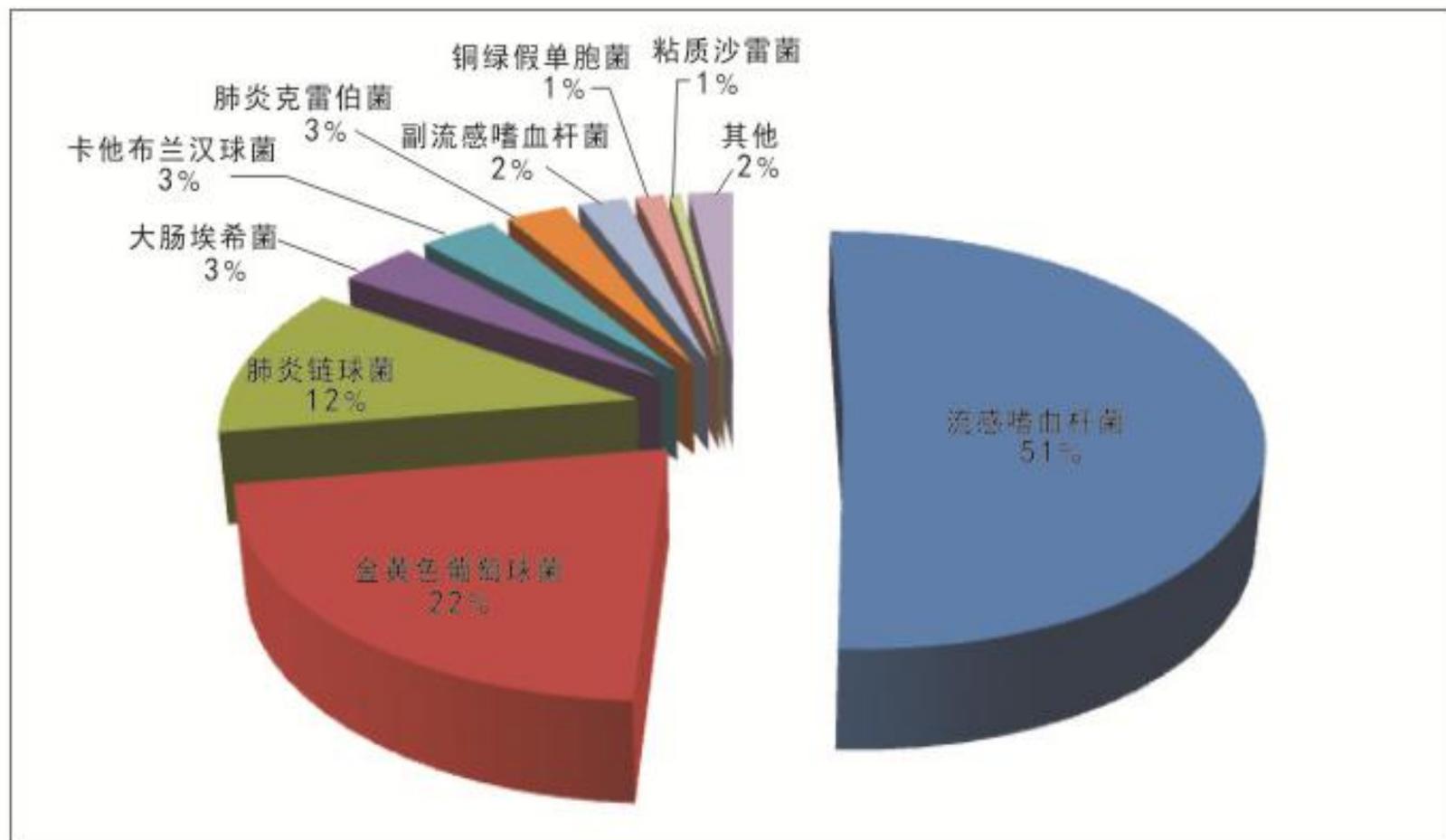
全院标本送检情况及病原菌分布

全院6073株病原菌构成比



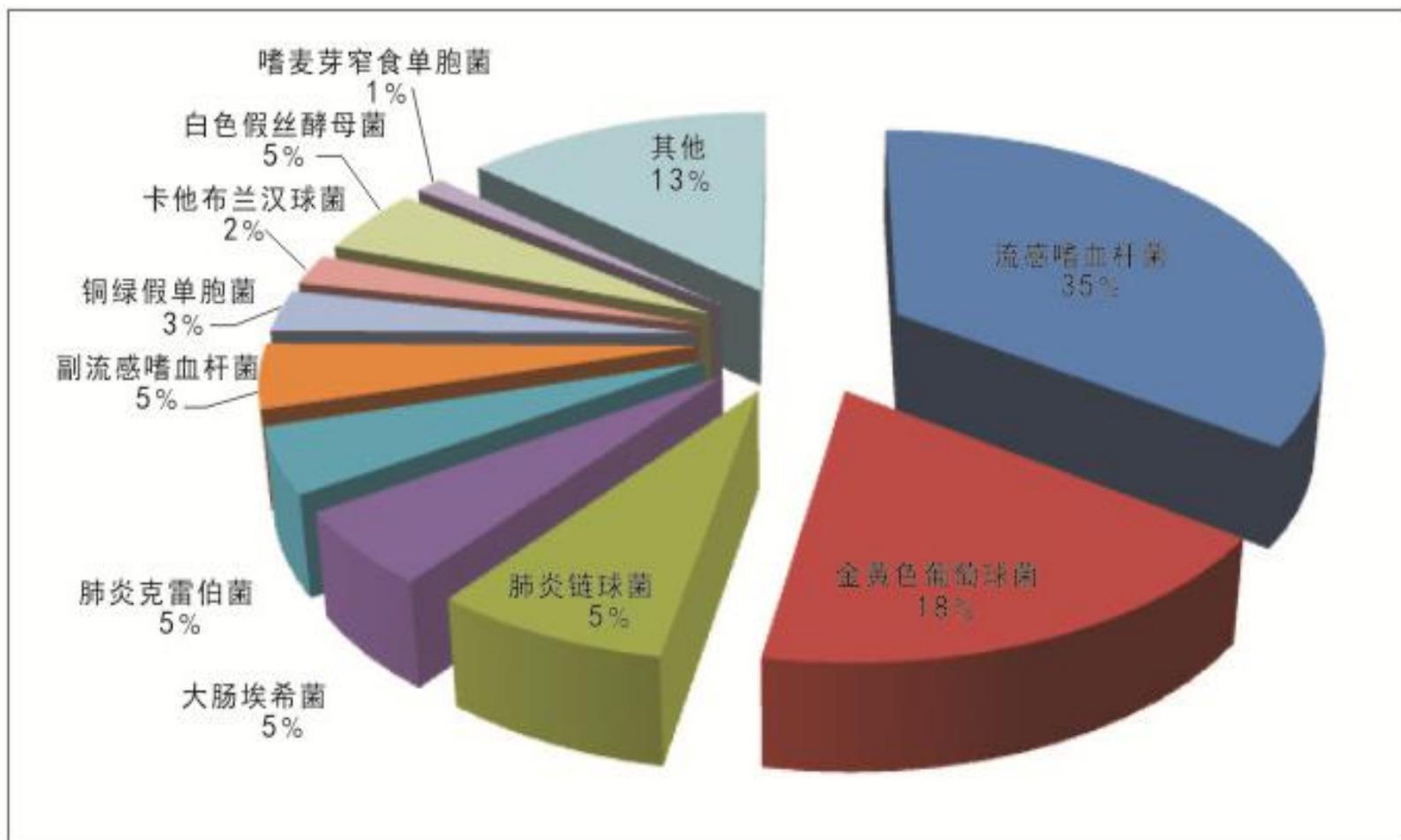
全院呼吸道感染病原菌构成及药敏分析

544株门诊呼吸道标本分离病原菌构成



全院呼吸道感染病原菌构成及药敏分析

1278株住院呼吸道标本分离病原菌构成



痰标本合格率低

尤其是儿童痰标本！

中华人民共和国卫生行业标准

WS/T 499—2017

细菌与真菌涂片镜检和培养结果 报告规范专家共识

王辉 马筱玲 宁永忠 胡继红 张莉萍 冯美菊 刘文恩 罗燕萍
陶传敏 孙宏莉 刘颖梅 吴文娟 赵建宏 喻华 廖康 胡志东
褚云卓 杨青 曾吉 赵宗珉 归巧娣 徐修礼 单斌 鲁炳怀
郑美琴 魏莲花 张嵘 韩立中 顾兵 朱镭 陈宏斌 李荷楠

下呼吸道感染细菌培养操作指南

Performance guideline for bacterial culture of lower respiratory tract infections

临床微生物标本规范化采集和送检 中国专家共识

牵头专家：胡必杰、倪语星、马小军、肖永红
编写专家（按首字母拼音排序）：
蔡绍曦、陈佰义、褚云卓、高晓东、顾兵、黄勋、李光辉、李卫光、刘
思远、刘运喜、陆群、卢晓阳、吕媛、孙自镛、索瑶、汤灵玲、王辉、
王明贵、王选锭、吴安华、徐英春、颜青、俞云松、战榕、张卫红、宗
志勇

2017-01-15 发布

2017-07-01 实施

中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会 发布

中华预防医学会医院感染控制分会
2017年1月

如何采集一个合格的痰标本

➤ 自然咳痰法：晨痰最佳，无菌生理盐水漱口，深部痰。幼儿可用手指轻叩胸骨柄上方，以诱发咳痰

➤ 诱导痰：雾化吸入45°C100mg/LNaCl水溶液。仅适用于结核分枝杆菌及耶氏肺孢子菌，其它病原菌检出效果差

➤ 吸痰法（手动、电动）：住院患儿多采用



➤ 支气管镜标本：保护毛刷标本（PSB）、支气管灌洗液（BW）、支气管肺泡灌洗液（BAL）法、支气管穿刺活检标本等。**标本质量高！**

口腔清洁、深部、避免口咽部菌群污染！！！！

- 标本运送：无菌防漏容器，2小时（室温）送至实验室。
- 标本的拒收标准及处理方式

拒绝标准	处理方式
容器上未贴上条码	退回原送检单位，如无法退回可进行培养，但不发结果报告
请求厌氧培养	删去厌氧菌培养之请求，除非微生物主管认可，始行厌氧菌培养，并向医师说明理由
痰液采集不当(如唾液)	退回送检单位，并注明样本不当，请指导病患正确收集方法并重送样本。儿科病人，特别是新生儿科等采样困难的患者，经涂片发现不适宜培养的标本可不退回，但在检验报告备注中应说明标本质量并建议重新送检。
干燥拭子	退回送检单位，并注明样本不当，请求重送样本
置室温超过4小时,容器不当或样本外漏	退回送检单位，并注明样本不当，请重送样本
一支拭子做细菌、T.B或霉菌培养	询问医师并补送样本，如不可能补送，则按医师建议优先次序为之

标本处理

- **基本要求**：接种标本及涂片在Ⅱ级生物安全柜内进行；尽快处理所有标本
- **肉眼观察**：观察痰液的颜色、粘度、有无血丝和是否呈脓性，如见有颗粒存在，则应注意可能与放线菌属及奴卡菌属感染有关。可以用唾液、含血粘液痰、水样、白粘带脓性、黄色脓性、其它等表示。
- **显微镜检查** 下呼吸道细菌学检验的标本均需涂片进行细胞学和细菌学显微镜检查，其目的是判别送检是否适合做细菌培养，并初步判定有否病原菌、病原菌的数量及其类别、有助于初步报告、选择培养基（如真菌）和对培养结果的综合分析。

- ◆ **涂片细胞学镜检** 采用方法是直接涂片或涂片染色，低倍（100X）检查20-40个视野分别计数白细胞、上皮细胞数量，以判断标本是否合格（白细胞减少的患者痰标本涂片镜检 >10 个白细胞/低倍镜时，可以判断是合格并可用细菌培养）。油镜用于观察细菌及形态。

分类	细胞数/低倍镜		备注
	白细胞	鳞状上皮细胞	
A	>25	<10	合格可用于细菌培养
B	>25	10-25	尚合格可用于细菌培养
C	<10	>25	不合格，重送标本
D	10-25	<25	根据临床判断是否可用于细菌培养

- ◆ **细菌涂片染色检查** 挑取痰液中脓性或带血部分涂成均匀薄片，革兰染色后镜检，油镜下观察细菌形态，排列和染色性，可初步推定菌属（或种），涂片中所见细菌的量及吞噬细胞内是否有细菌等。如发现酵母样菌或菌丝或孢子，应做出相应报告和真菌学检查。

▶ **培养基的选择和标本接种孵育**

血平板



嗜血杆菌分离平板



5~10%CO₂孵箱



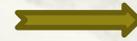
麦康凯或中国蓝平板



沙保弱琼脂平板



普通孵箱



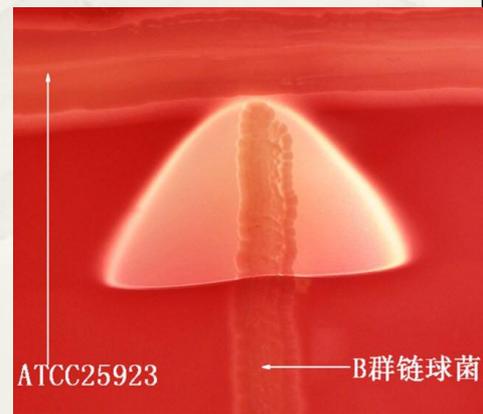
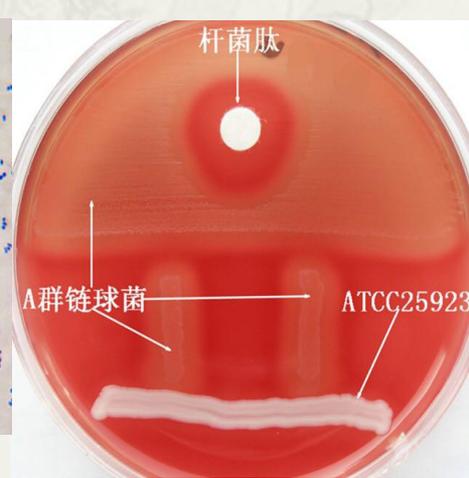
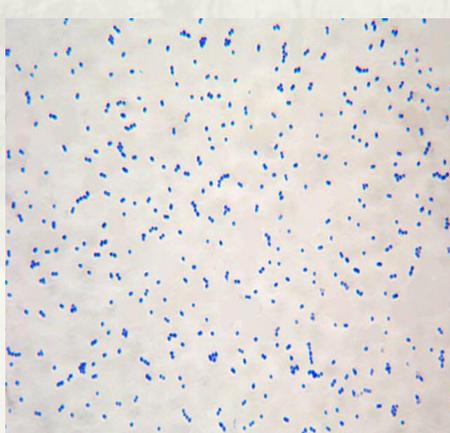
必选项

可选项

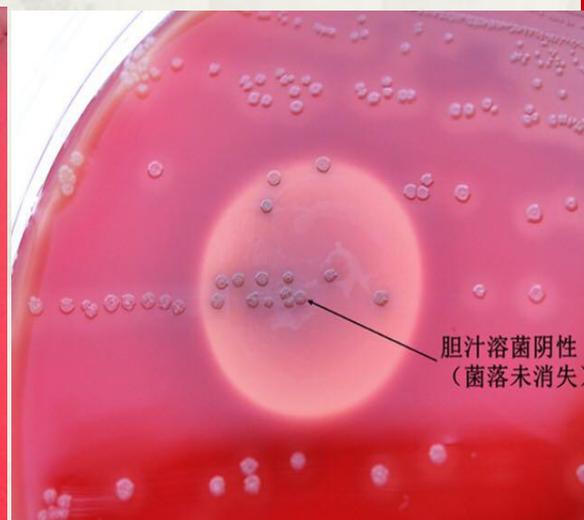
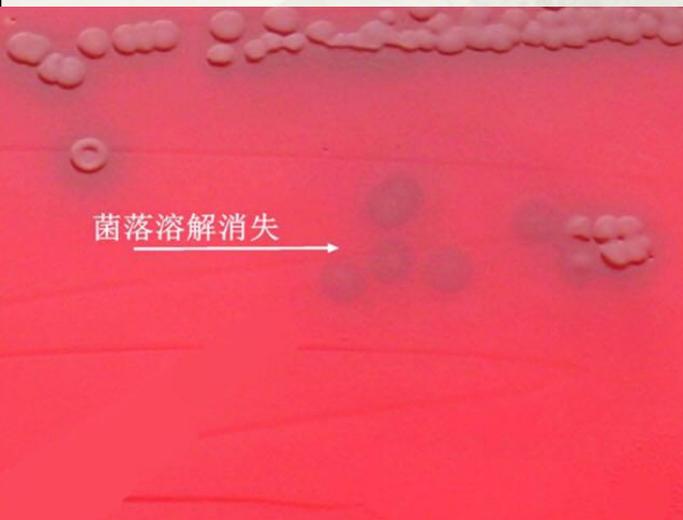
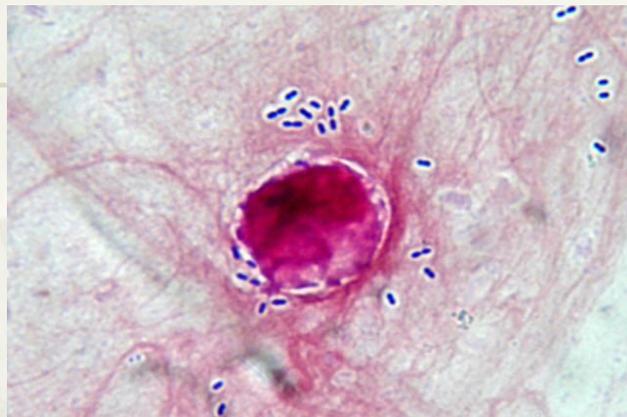
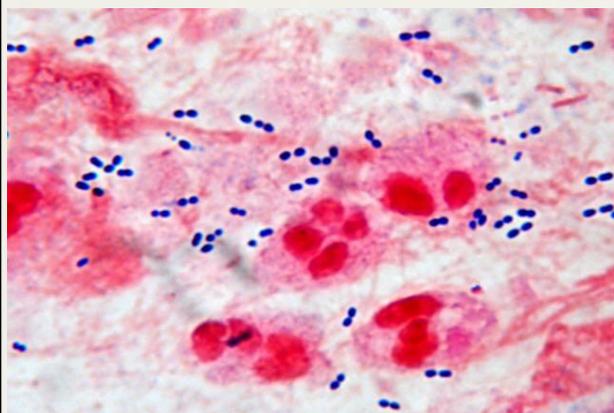
- **液化**：浓性痰需液化
- **接种**：分区划线
- **连续培养并观察慢生长菌**：观察培养18h-24h后平板，为检出可能生长的丝状真菌、慢生长菌、苛养的革兰阴性杆菌如鲍特菌属，平板在检查并连续培养至72小时，可能发现慢生长菌。

分离并鉴定下呼吸道重要病原菌

β-溶血链球菌(化脓链球菌、B群链球菌)

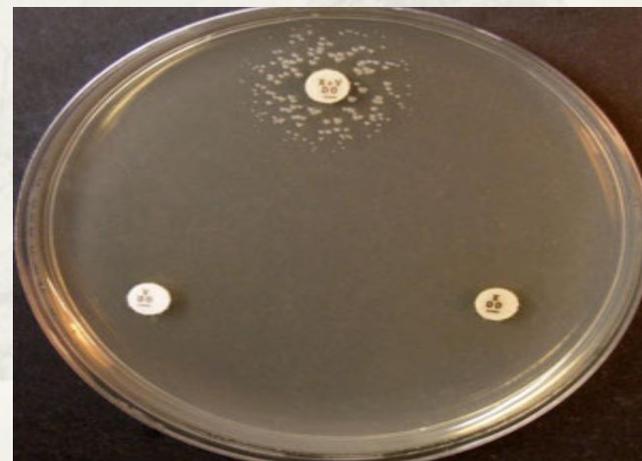
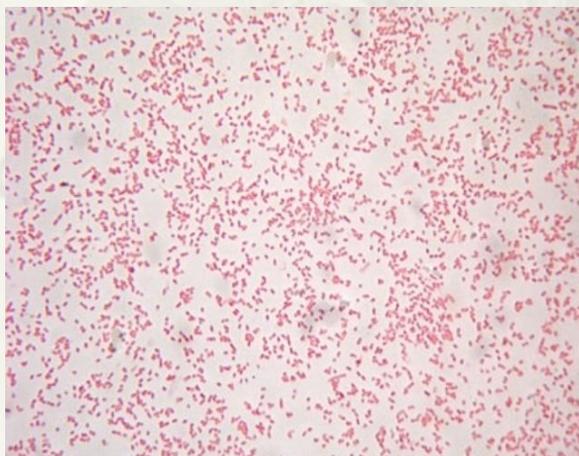
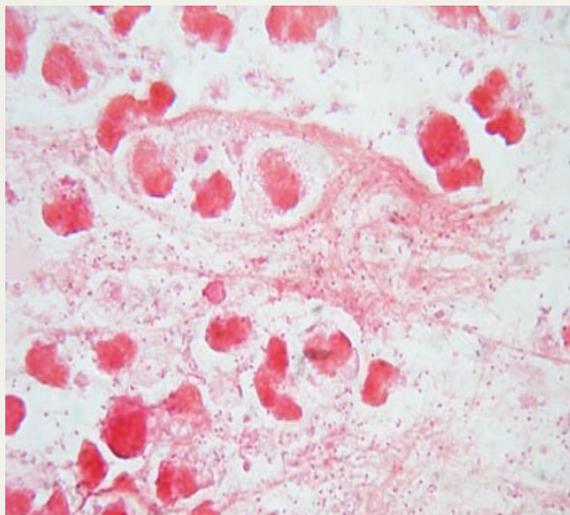


肺炎链球菌

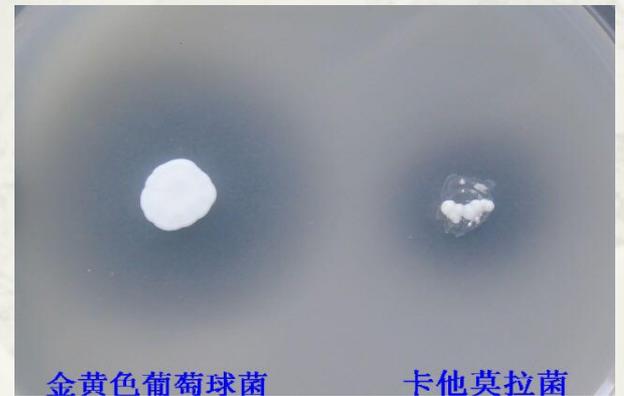
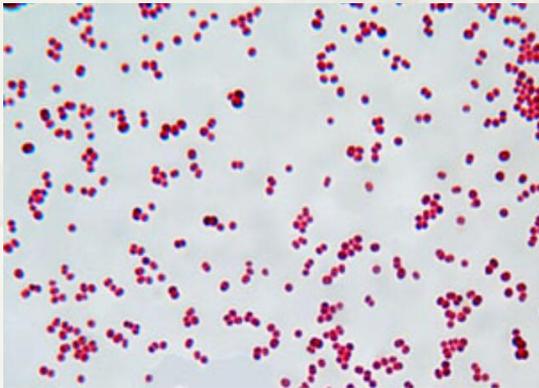
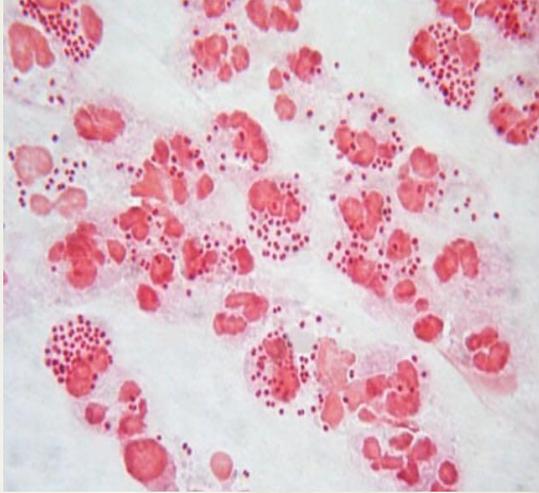


胆汁溶菌试验及OP敏感试验联合检测可减少错误报告

流感嗜血杆菌

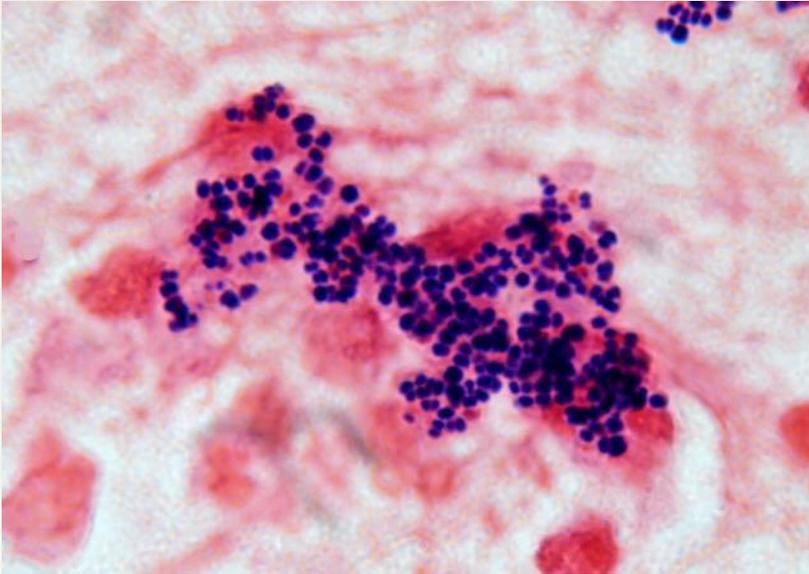


卡他莫拉菌



菌落可推移，DNA酶阳性， β 内酰胺酶90%以上菌株阳性

葡萄球菌属及肠球菌属



- ◆ 革兰染色显示占优势的成堆球菌与白细胞相关，只报有临床意义数量的金黄色葡萄球菌
- ◆ 住院患者，依照感控原则，即使少量也需检测是否为MRSA
- ◆ 凝固酶阴性葡萄球菌几乎均为呼吸道正常菌群
- ◆ 一般情况下，少量生长的肠球菌无需报告

革兰阴性杆菌

在麦康凯或中国蓝平板上生长良好的革兰阴性杆菌,依照以下快速试验筛查:

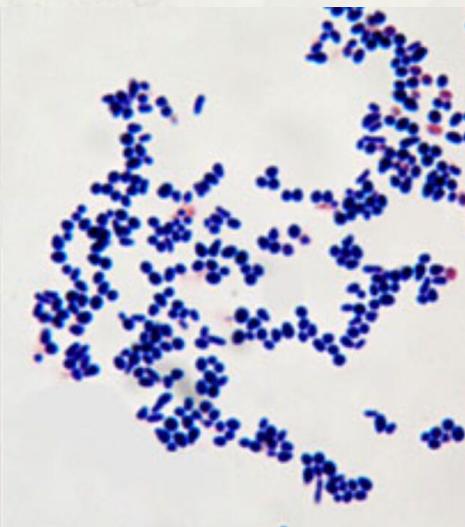
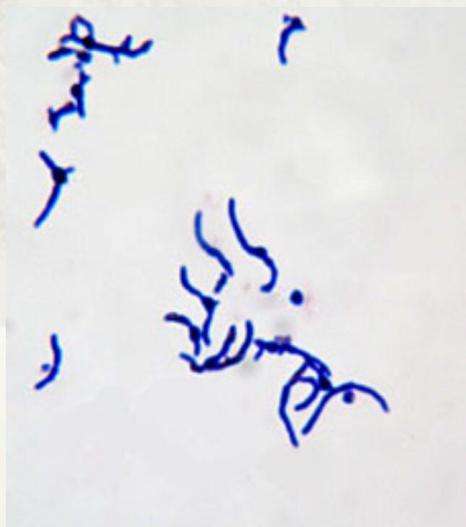
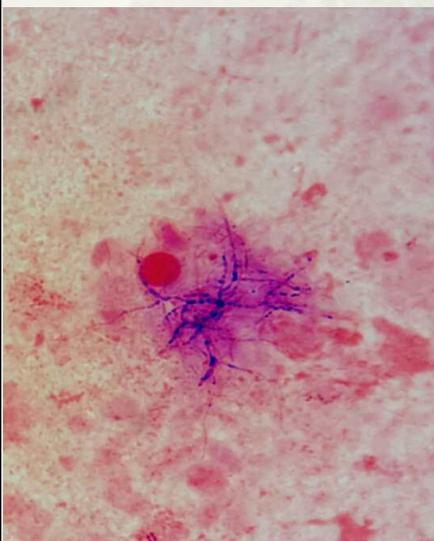
- 若只生长了一种细菌并达到了有临床意义的数量,而无其他致病菌,通过初步试验筛查,此菌若为肠杆菌科细菌特别是肺炎克雷伯菌,需做鉴定和药敏试验;
- 对于住院患者,不管是否有其他病原菌,检查有意义数量的铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌、洋葱伯克霍德菌和嗜麦芽窄食单胞菌,因这些菌多是典型的多重耐药菌,可造成医院内流行;
- 若生长一种以上其他等量的革兰阴性杆菌,做初步试验,并报告(如:吲哚、氧化酶、在麦康凯平板上的气味和形态、菌落色素和克氏双糖试验的结果)。



革兰阳性杆菌

只对以下培养生长的革兰阳性杆菌处理,因其他革兰阳性杆菌通常不引起肺炎,具体如下:

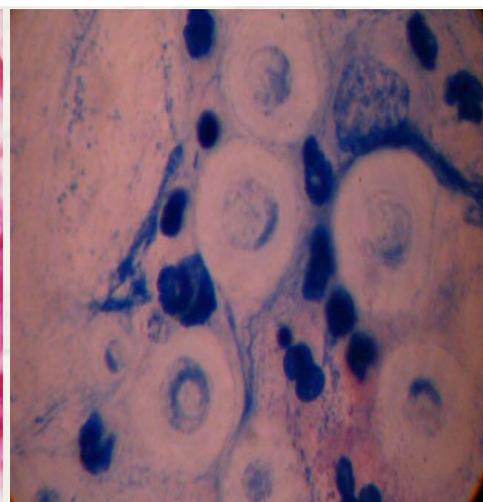
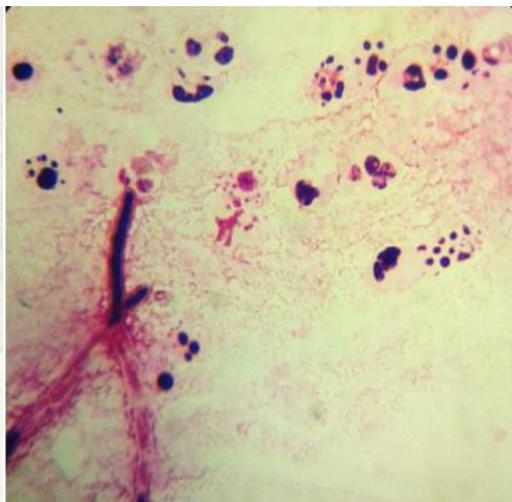
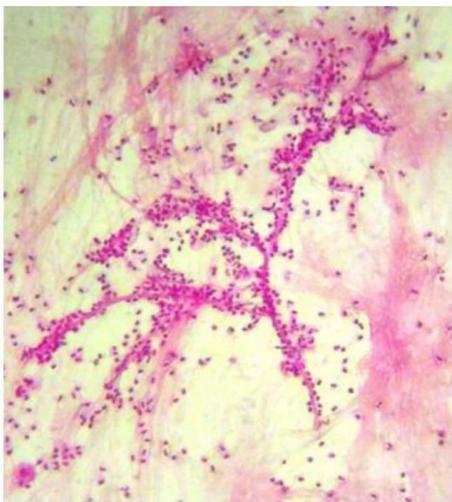
- 筛查并排除任何数量的来自免疫抑制患者的奴卡菌属和马红球菌(黏液样菌落、脲酶阳性);
- 如有大的革兰阳性芽孢杆菌,需排除炭疽芽孢杆菌和蜡样芽孢杆菌;
- 有限地鉴定棒状杆菌。当下述两种情况存在且细菌呈大量优势生长时,使用鉴定革兰阳性杆菌的商品试剂盒进行鉴定,包括:
 - 当菌株快速脲酶试验阳性时(假白喉棒杆菌、假结核棒杆菌脲酶阳性);
 - 标本来自ICU病房的插管患者。



真菌

对生长的丝状真菌或酵母样真菌的处理方法如下：

- 对丝状真菌做鉴定(除外实验室或环境污染的霉菌,如青霉菌)；
- 从培养超过 48 h 的平皿上分离双相真菌(如荚膜胞浆菌和球孢子菌)或酵母样真菌的菌落；
- 检查陈旧培养物以排除新生隐球菌,无需对其他酵母样真菌做进一步鉴定；
- 念珠菌属于口腔正常定植菌群,一般情况下,对于免疫力正常人群,即使从下呼吸道标本中分离到念珠菌,除非有组织病理学证据,否则无需进一步鉴定;但对于肿瘤患者(如:白血病)、肺移植患者或新生儿,要进一步鉴定来自下呼吸道标本中的酵母样真菌及念珠菌。



结果报告

- ▶ 标本涂片革兰染色细胞学和细菌学显微镜镜检未发现有临床诊断意义结果，同时分离培养的细菌为定植的正常菌群，最终报告为“正常咽喉菌群”
- ▶ 标本涂片革兰染色细胞学和细菌学显微镜镜检发现有临床诊断意义结果（及时初步报告），同时分离培养检出优势菌与涂片染色显微镜镜检结果相符时，最终报告应包括优势菌鉴定的规范细菌名称和药敏试验结果
- ▶ 标本涂片革兰染色细胞学和细菌学显微镜镜检发现有临床诊断意义结果（及时初步报告），细菌分离培养未检出优势菌，与涂片染色显微镜镜检结果不相符时，最终报告为“混合菌丛，未分离出病原菌”
- ▶ 标本涂片革兰染色细胞学和细菌学显微镜镜检未发现有临床诊断意义结果，但分离培养出少量病原菌，培养结果与涂片染色显微镜镜检结果不相符时可不做药敏试验（以免误导），最终报告仅报告分离细菌鉴定结果

结果报告说明

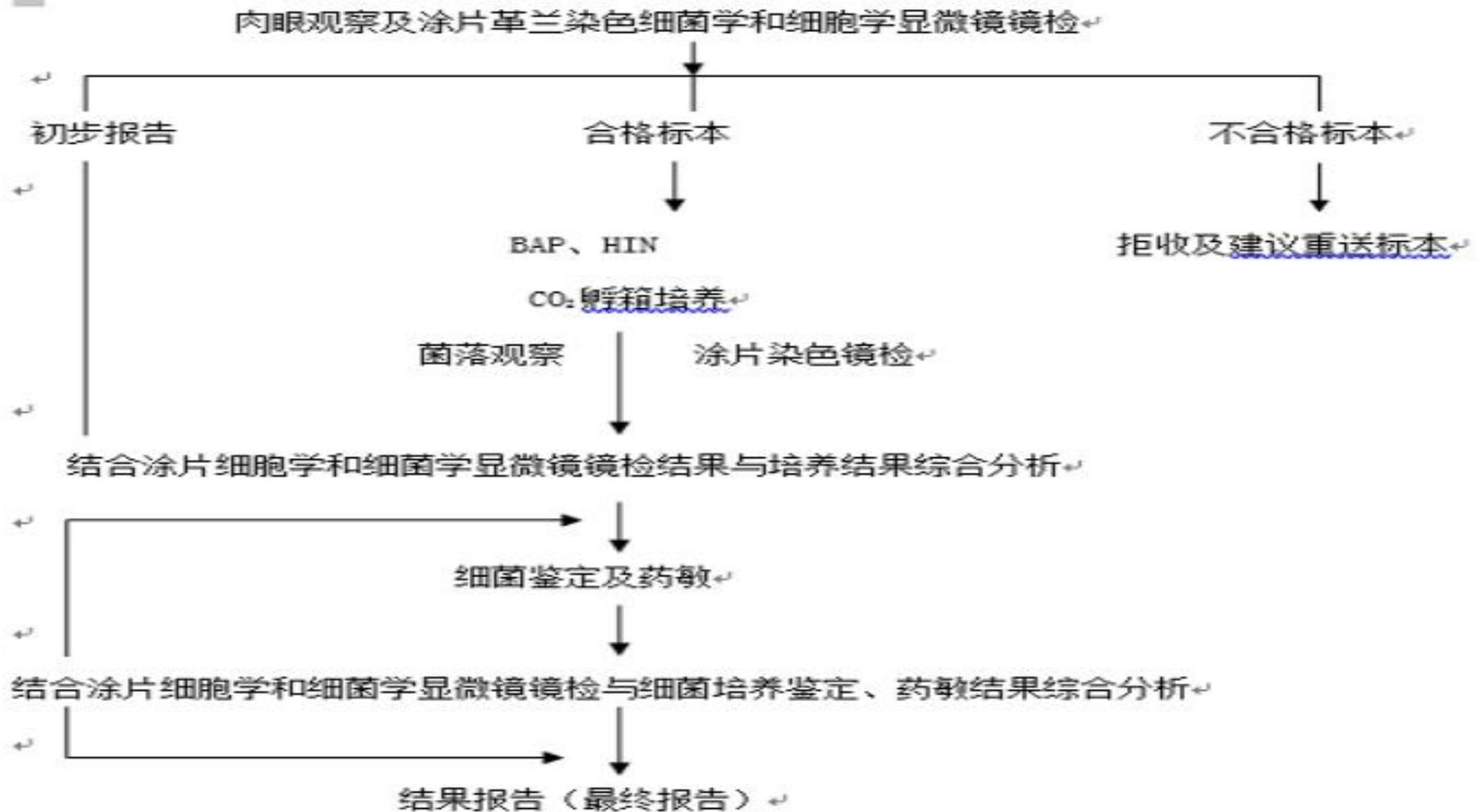
痰、支气管吸出物标本涂片革兰染色结果解释应注意以下情况：

- a) 白细胞和优势菌(不粘附在鳞状上皮细胞上)有助于预测肺部致病菌,应该报告;
- b) 每个油镜视野可见大于 10 个或小于 10 个单一形态细菌并与白细胞相关(在白细胞周围,特别是位于白细胞内的细菌),有助于预测肺部致病菌,应该报告;涂片中少于 1 个菌/20 个油镜视野的少量细菌不必报告;
- c) 虽然由两种致病菌同时引起的感染不常见,但当两种形态的细菌均与白细胞相关时也应报告;
- d) 即使涂片未见细菌时仍有助于评价患者状况,可能隐藏着某些特殊菌,如军团菌、内源性真菌、结核分枝杆菌或其他可引起非典型肺炎的致病菌;
- e) 质量合格的标本中,涂片有正常菌群及多种细菌(通常白细胞内有空泡或液泡),提示有吸入性肺炎,应该报告。

结果报告说明

- a) 当实验室报告分离菌是肺炎链球菌或流感嗜血杆菌时,应注意也可能仅是定植菌;
- b) 仅当培养生长的革兰阴性杆菌或金黄色葡萄球菌是优势菌,且涂片也提示这些形态的细菌与感染相关时才报告;
- c) 培养阴性时也不能排除患者的下呼吸道感染,因培养的阳性率低,且有可能会受到临床使用抗菌药物的影响而致阴性结果;
- d) 培养阴性不能排除患者可能存在由非典型 CAP 病原引起的下呼吸道感染,需用分子诊断、血清学等方法检测肺炎支原体、肺炎衣原体和军团菌属抗体确诊;
- e) CAP 治疗大部分是经验性治疗,若有效则不必确定病原体,经验性治疗失败则需确定病原体;对于住院患者应争取确定病原体。

痰标本的检验流程



培养基的质量控制

- **培养基的标识**：生产日期（批号）、效期、质量控制、储存条件等
- **质控的内容**
 - ✓ 外观
 - ✓ 无菌试验
 - ✓ 生长试验
 - ✓ 抑制试验（适用时）
- **质控的频率**：每批、每一货次

试剂、染色液和诊断血清的质量控制

- 染色剂的质量控制（革兰、抗酸）
- ✓ 质控片或质控标本的准备：涵盖阴性、阳性
- ✓ 质控频率：每一批，使用中每周（若检测频率小于每周1次，则实验当日）

常用生化试剂、鉴定纸片的质量控制

- 氧化酶、触酶、凝固酶：新批号，使用中每天，使用阴、阳性。
- X、V、V+X因子纸片、OPTOCHIN、ONPG等：新批号，使用中每周。
- β 内酰胺酶：**Cefinase™** 每批1次。

细菌鉴定的质量控制

- 手工鉴定试验
- 自动化仪器的质量控制
- ✓ 全面的质量控制
- ✓ 精简的质量控制

人员的质量控制

- 有颜色视觉障碍者不应从事涉及辨色的微生物学检验
- 每年应对**各级人员**制定培训计划
- 每年评估员工的工作能力。新近员工，最初6个月内应至少进行2此能力评估；离岗6个月以上，应再培训再评估。
- 人员比对：每半年1次，每次至少5份临床样本
 - ✓ 显微镜检查
 - ✓ 培养结果判读
 - ✓ 抑菌圈直径的测量
 - ✓ 结果报告

PT/实验室间比对

- PT计划
 - ✓ 尽量涵盖所有项目
 - ✓ 视病人标本使用常规方法进行检测
 - ✓ 禁止实验室之间打听结果
 - ✓ PT失败的纠正及预防措施
- 实验室间比对
- 细菌耐药监测网数据的反馈分析

小结

- 指导临床或患者家属正确采集合格痰标本
- 严格遵循已有的标准/指南，病原菌心中有数、能识别
- 只有在涂片提示标本合格后才能进行培养/药敏



谢谢！